

表 2 不同组合的药效预测

Table 2 Prediction of responses in different components combination

配伍组	实验值	文献值 ^[2]		SVM ^{a)}		RBFNN		配伍组	实验值	文献值 ^[2]		SVM ^{a)}		RBFNN	
		预测值	误差	预测值	误差	预测值	误差			预测值	误差	预测值	误差	预测值	误差
ABCDEF	8.000	8.000	0	7.816	-0.184	7.997	-0.003	BC	/	7.133	/	7.252	/	7.099	/
ABC	7.400	7.400	0	7.442	0.042	7.304	-0.096	BCD	/	6.867	/	6.970	/	6.917	/
ABE	8.200	n. a. ^{b)}	/	7.990	-0.210	8.037	-0.163	BCDE	/	7.400	/	7.363	/	7.501	/
ADF	7.200	6.933	-0.267	7.013	-0.187	6.914	-0.286	BCDEF	/	7.733	/	7.643	/	7.792	/
AEF	7.400	n. a. ^{b)}	/	7.598	0.198	7.679	0.279	CDEF	/	7.067	/	7.124	/	7.146	/
ACD	6.400	n. a. ^{b)}	/	6.594	0.194	6.472	0.072	DE	/	6.867	/	6.918	/	7.001	/
BCF	7.400	n. a. ^{b)}	/	7.523	0.123	7.391	-0.009	DEF	/	7.200	/	7.196	/	7.293	/
BDF	7.200	7.333	0.133	7.360	0.160	7.357	0.157	EF	/	7.467	/	7.439	/	7.473	/
BDE	7.600	n. a. ^{b)}	/	7.493	-0.107	7.649	0.049	ABD	/	7.267	/	7.322	/	7.270	/
CDE	6.600	6.733	0.133	6.801	0.201	6.563	-0.037	ABDE	/	7.800	/	7.716	/	7.855	/
CEF	7.600	n. a. ^{b)}	/	7.398	-0.202	7.326	-0.274	ABDEF	/	8.133	/	7.924	/	8.145	/
—	6.600	n. a. ^{b)}	/	6.795	0.195	6.598	-0.002	ACE	/	7.267	/	7.269	/	7.240	/
ABEF	/	8.400	/	8.165	/	8.327	/	ACEF	/	7.600	/	7.533	/	7.531	/
CD	/	6.200	/	6.424	/	6.269	/	BCE	/	7.667	/	7.667	/	7.682	/
AB	/	7.533	/	7.574	/	7.452	/	BCEF	/	8.000	/	7.919	/	7.973	/
ABCD	/	7.133	/	7.164	/	7.121	/	CDF	/	6.533	/	6.766	/	6.563	/
ABCDE	/	7.667	/	7.562	/	7.706	/	平均绝对误差 ^{c)}		0.107		0.167		0.119	

^{a)} 主要参数: LibSVM 2.81 工具包, RBF 核函数, $\gamma=2^{-4}$, $C=2^3$, 留一法检验; ^{b)} 未报道; ^{c)} 平均绝对误差 = $\sum |\text{误差}| / N$, 其中 N 为 5 或 12

^{a)} main parameters: LibSVM 2.81 package, RBF kernel, $\gamma=2^{-4}$, $C=2^3$, jackknife test; ^{b)} not available; ^{c)} mean absolute error = $\sum |\text{error}| / N$, where N equals to 5 or 12

参考文献:

- [1] 严永清. 中药现代研究的思路与方法 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.
- [2] 郑青山, 何迎春, 杨娟, 等. 药物相互作用分析与复方药效模拟: 一个方法学研究 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(8): 1106-1112.
- [3] 姚美村, 乔延江, 袁月梅, 等. 基于人工神经网络方法的中药功效归类研究 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 689-691.
- [4] 范晓辉, 程翼宇. 中药复杂组效关系的变结构神经网络辨识方法 [J]. 高等学校化学学报, 2004, 25(11): 2004-2009.
- [5] 王泽, 顾勤兰, 王志祥. 基于遗传神经网络的中药葛根及同属植物的质量评价研究 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1580-1582.
- [6] 张玉瑞, 陈剑波. 基于 RBF 神经网络的时间序列预测 [J]. 计算机工程与应用, 2005, 41(11): 74-76.
- [7] Chen C, Tian Y X, Zou X Y, et al. Prediction of protein secondary structure content using support vector machine [J]. Talanta, 2007, 71(5): 2069-2073.

五福化毒丸的质量标准研究

郑瑾, 张丽娟*, 宋新波, 杨振容, 刘黄刚

(天津中医药大学, 天津 300193)

摘要:目的 建立中成药五福化毒丸的质量标准。方法 采用显微和薄层鉴别法进行定性鉴别, 采用高效液相色谱法进行测定。结果 显微法鉴别出成药中 11 味药; 采用薄层色谱法定性鉴别了方中的黄连和赤芍, 色谱斑点清晰, 分离度良好, 阴性无干扰; 以 HPLC 法测定该丸剂中甘草酸和连翘苷, 方法精密度、稳定性、重复性良好, 回收率分别为 95.75% 和 98.49%, RSD 分别为 0.55% 和 1.12% ($n=6$)。结论 本实验所确定的质量分析方法稳定可靠, 可以用于五福化毒丸的质量标准研究。

关键词: 五福化毒丸; 显微鉴别; 薄层色谱; 高效液相色谱; 甘草酸; 连翘苷

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2009)08-1241-05

五福化毒丸是《中国药典》2005 年版一部收载的传统中药成方制剂, 全方由水牛角浓缩粉、连翘、

青黛、黄连、牛蒡子(炒)、玄参、地黄、桔梗、芒硝、赤芍、甘草 11 味中药组成的传统蜜丸。其具有清热解

* 收稿日期: 2008-10-27

作者简介: 郑瑾 (1983—), 女, 天津人, 在读硕士, 主要从事中药提取纯化工艺和质量控制的研究。

Tel: (022) 23111486 E-mail: nicolezhengjin@163.com

* 通讯作者 张丽娟

毒、凉血消肿的功效,用于血热毒盛,小儿疮疖,痱毒,咽喉肿痛,口舌生疮,牙龈出血,牙龈。在原标准仅载有青黛、桔梗、黄连、牛蒡子、甘草及连翘的显微鉴定和牛蒡子、青黛、甘草的薄层色谱鉴别。为进一步提高其质量标准,更有效地控制其内在质量,本实验拟通过显微鉴定法、TLC法、HPLC法对五福化毒丸进行定性和定量研究,以完善五福化毒丸的质量检测方法。

1 仪器与材料

Olympus C5050-CX41型显微摄影仪;Reprostar 3薄层色谱数码相机照相系统;Shimadzu LC-10AD高效液相色谱仪,SPD-10A UV检测器,Thermo ODS C₁₈反相柱(250 mm × 4.6 mm, 5

μm), N-2000双通道色谱工作站(浙江大学), KQ2200DB型数控超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

五福化毒丸(河北药都制药集团有限责任公司,批号070602、070801、080101)。各对照药材和盐酸小檗碱、芍药苷、甘草酸铵、连翘苷(批号分别为110713-200208、110736-200629、110731-200513、110821-200609)对照品均由中国药品生物制品检定所提供。甲醇、乙腈为色谱纯,水为新制重蒸水,冰醋酸、三氯甲烷为分析纯。

2 显微鉴定

以水溶解蜜丸,滤过后制备粉末制片,镜下观察各药味的鉴别特征。见图1。

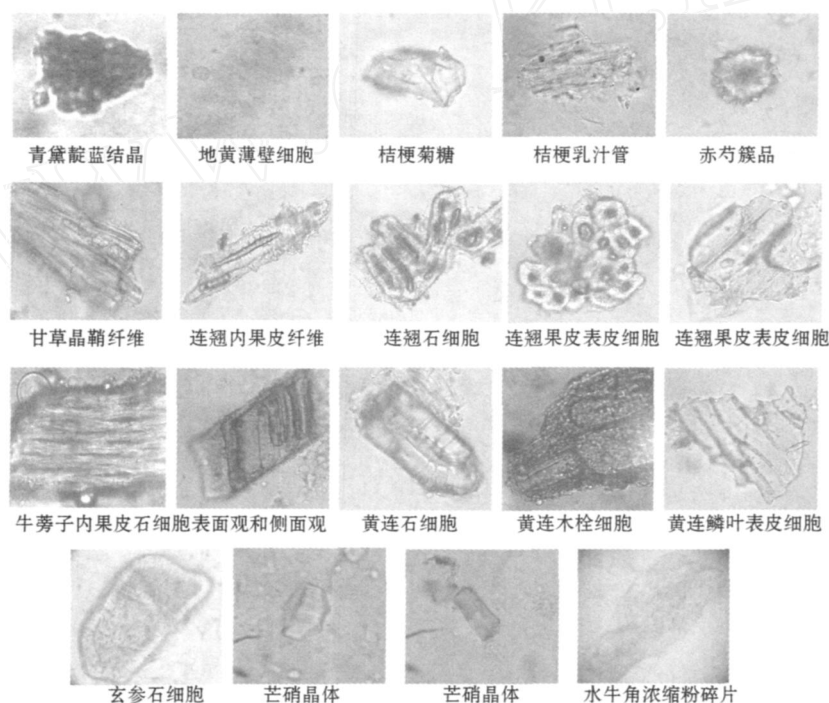


图1 五福化毒丸中组分的显微特征

Fig 1 Microcharacteristics of components in Wufu Huadu Pill

青黛:靛蓝结晶为不规则蓝色块片或颗粒,聚集成堆。

地黄:薄壁细胞类多角形,大多皱缩,形状较不规则,细胞中含有棕色类圆形梭状物。

桔梗:菊糖呈扇形或不规则形,极多。乳汁管为有节联结乳汁管,内有细微的黄棕色颗粒状物。

赤芍:草酸钙簇晶较多,单个散在。

甘草:晶鞘纤维多成束,细胞周围薄壁细胞含草酸钙方晶。

连翘:内果皮纤维成束或散在或上下交错排列,壁厚,单个细胞成短梭形或不规则,具有较细的孔

沟。石细胞单个散在或成群,多呈类圆形,孔沟明显。果皮表皮细胞黄棕色,细胞断面观呈类方形,表面观细胞呈类圆形或类方形,内有黄棕色物质,外壁增厚。

黄连:石细胞黄色至黄棕色,类方形、类长方形、类圆形或多角形,壁厚,有明显的孔沟和纹孔。鳞叶表皮细胞黄棕色,长方形或长多角形,细胞壁波状弯曲或连珠状增厚。木栓细胞壁较厚,黄棕色类多角形。

牛蒡子:内果皮石细胞表面观尖梭形镶嵌紧密,侧面观呈类长方形或长条形,木化。

芒硝:晶体多有棱角,呈多边形,有折光性。

玄参:石细胞较多,多单个散在,黄棕色,呈长方形、类方形、类圆形、三角形或棱形,多较大,壁较薄,纹孔细小,孔沟多分叉,层纹明显,胞腔较大。

水牛角浓缩粉:不规则,多呈柴片状,边缘不平整,浅灰白色或淡灰黄色。纵断面碎片多见,表面可见细长棱状纹理,呈同方向交错排列,有较多纵长裂缝,布有细微灰棕色色素颗粒。

3 薄层色谱鉴别

3.1 黄连的薄层色谱鉴别:称取五福化毒丸 8.605 g,加等量硅藻土研匀,加甲醇 25 mL 回流 15 min,滤过,收集滤液,浓缩至 5 mL,作为供试品溶液。按处方量自制成药 8.605 g,同法制备阳性对照溶液。按处方量自制缺黄连的成药 8.555 g,同法制备阴性对照溶液。取盐酸小檗碱对照品 1 mg,制成 0.5 mg/mL 的溶液,作为对照品溶液。用毛细管分别吸取黄连阴性对照溶液、供试品溶液、阳性对照溶液、盐酸小檗碱对照品溶液各 10 μ L,分别点样于同一硅胶 G 薄层板上,以苯-醋酸乙酯-异丙醇-甲醇-水 (6:3:1.5:1.5:0.3) 为展开剂,置氨蒸气饱和的展开缸内预饱和 15 min,上行展开,取出,晾干。置紫外灯 (365 nm) 下检视。见图 2。结果在供试品溶液、阳性对照溶液和盐酸小檗碱对照品色谱中相应位置上均有一相同颜色的黄绿色荧光斑点,阴性则无。

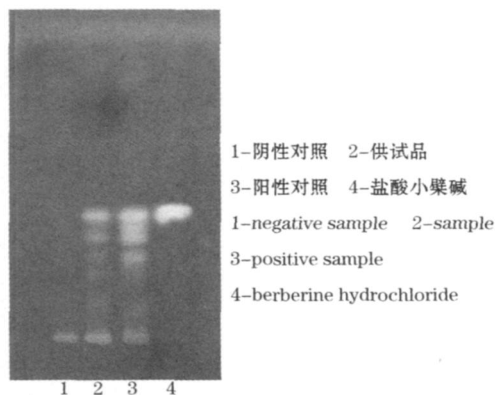


图2 五福化毒丸中黄连的薄层色谱图

Fig 2 TLC Chromatogram of Rhizoma Coptidis in Wufu Huadu Pill

3.2 赤芍的薄层色谱鉴别:称取五福化毒丸 8.604 g,加等量硅藻土研匀,加乙醇 10 mL,超声提取 10 min,滤过。滤液蒸干,残渣加乙醇 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。按处方量自制成药 8.604 g,同法制备阳性对照溶液。按处方量自制缺赤芍的成药 8.104 g,同法制备阴性对照溶液。取芍药苷对照品 2 mg,加乙醇制成 2 mg/mL 的溶液作为对照品溶

液。用毛细管分别吸取赤芍阴性对照溶液、供试品溶液、阳性对照溶液、赤芍对照品溶液各 10 μ L,分别点样于同一硅胶 G 薄层板上,以三氯甲烷-醋酸乙酯-甲醇-甲酸 (40:5:10:0.2) 为展开剂,于展开缸内预饱和 15 min,上行展开,取出,晾干。喷以 5% 香草醛硫酸溶液,加热至斑点显色清晰。见图 3。结果在供试品溶液、阳性对照溶液和赤芍对照品溶液色谱中相应位置上均有一相同颜色的蓝紫色斑点,阴性对照则无。

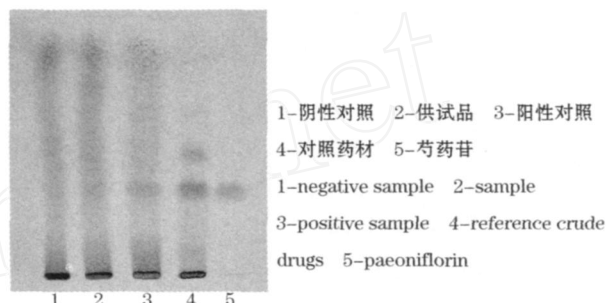


图3 五福化毒丸中赤芍的薄层色谱图

Fig 3 TLC Chromatogram of Radix Paeoniae Rubra in Wufu Huadu Pill

4 五福化毒丸中甘草酸的 HPLC 法测定

4.1 色谱条件: C_{18} 色谱柱 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水-冰醋酸 (37:60:3); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm。

4.2 对照品溶液的制备: 取甘草酸铵对照品 1 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 超声处理 5 min, 取出放冷, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 (甘草酸铵质量浓度为 18 μ g/mL)。

4.3 供试品溶液的制备: 五福化毒丸剪碎, 取 1.4 g, 精密称定, 置 50 mL 的具塞三角瓶中, 加入 2% 氨水-50% 甲醇 (1:1), 超声 60 min, 取出放冷, 补足质量, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 取滤液, 备用。

4.4 阴性对照溶液的制备: 按处方量精密称取除去甘草的各药材粉末 (粉碎过 100 目), 混匀成阴性对照粉末, 按供试品溶液的制备方法操作, 即得。

4.5 标准曲线的制备: 取 18 μ g/mL 甘草酸铵对照品溶液, 用微量注射器分别吸取 2、6、10、12、14、16 μ L 注入高效液相色谱仪, 进样测定, 记录甘草酸铵峰面积。以峰面积为纵坐标, 进样量为横坐标绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 5078.6X + 3672.6$, $r = 0.9993$ 。结果表明甘草酸铵在 0.036~0.360 μ g 与峰面积的线性关系良好。

4.6 精密度试验: 精密吸取 18 μ g/mL 甘草酸铵对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 连续进样测

定,记录峰面积,结果其 RSD 为 0.66 % ($n=6$)。

4.7 重现性试验:精密称取同一批五福化毒丸碎块 1.4 g,精密称定 6 份,制备供试品溶液,进样测定,记录甘草酸铵峰面积,计算得其 RSD 为 1.76 % ($n=6$)。

4.8 稳定性试验:取同一供试品溶液,分别在 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12 h 进样,测定甘草酸铵峰面积,计算得其 RSD 为 1.63 %,说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

4.9 回收率试验:称取样品 6 份,每份 0.7 g,精密称定,置于 50 mL 锥形瓶中,每份按甘草酸质量 1:1 的比例加入对照品,制备供试品溶液,进样测定。计算得平均回收率为 95.75 %,RSD 为 0.55 %。

4.10 样品测定:取不同批号的五福化毒丸,剪碎,每批称定 2 份,每份 1.4 g,制备供试品溶液,微量注射器准确吸取样品液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,进样测定,以外标法计算甘草酸的质量分数。结果见表 1,色谱图见图 4。

表 1 五福化毒丸中甘草酸和连翘苷的测定结果 ($n=2$)

Table 1 Determination of glycyrrhizic acid and forsythoside in Wufu Huadu Pill ($n=2$)

批号	甘草酸/(mg·g ⁻¹)	连翘苷/(mg·g ⁻¹)
070801	0.651 7	0.497 2
070602	0.711 3	0.238 2
080101	0.736 2	0.544 0

5 五福化毒丸中连翘苷的 HPLC 法测定

5.1 色谱条件: C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水-36 % 冰醋酸 (22:78:1); 体积流量: 1.0 mL/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 230 nm。

5.2 对照品溶液的制备: 取连翘苷对照品 5 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加入适量甲醇溶解, 加甲醇至刻度, 摇匀, 即得 0.0700 mg/mL 连翘苷对照品贮备液。精密量取连翘苷对照品贮备液适量, 加甲醇制成 21 μ g/mL 的对照品溶液。

5.3 供试品溶液的制备: 五福化毒丸剪碎, 取 6 g, 精密称定, 置具塞三角瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 密塞, 称定质量, 超声处理 30 min, 放冷, 再称定质量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 滤过。精密量取续滤液 25 mL, 蒸干, 残渣加水 20 mL 使溶解, 用三氯甲烷振摇提取 5 次, 每次 20 mL, 合并三氯甲烷液, 回收至干。残渣用 50 % 甲醇溶解, 转移至 5 mL 量瓶中, 加 50 % 甲醇至刻度, 摇匀, 用微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得, 备用。

5.4 阴性对照溶液的制备: 按处方量精密称取除去连翘的各药材粉末 (粉碎过 100 目), 混匀成阴性对

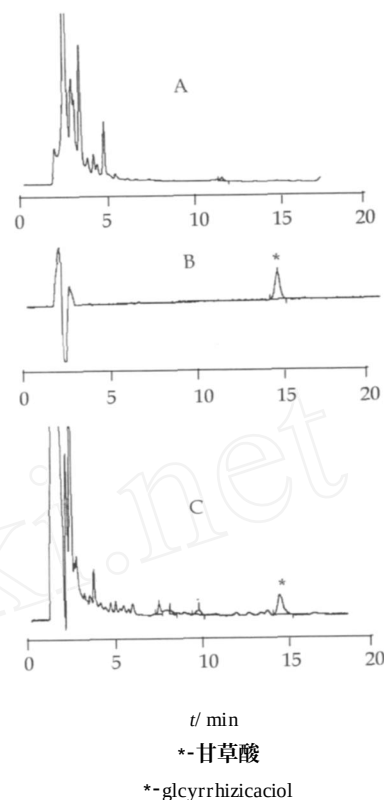


图 4 阴性对照 (A)、甘草酸对照品 (B) 和五福化毒丸 (C) 的 HPLC 色谱图

Fig 4 HPLC Chromatograms of negative sample (A), glycyrrhizic acid reference substance (B), and Wufu Huadu Pill (C)

照粉末,按照供试品溶液的制备方法操作,即得。用微量注射器吸取 10 μ L 测定峰面积。

5.5 标准曲线的制备: 取 21 μ g/mL 连翘苷对照品溶液,用微量注射器分别吸取 2、4、6、10、12、18 μ L 注入高效液相色谱仪,进样测定,记录峰面积。以峰面积为纵坐标,进样量为横坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 19.478 X + 2.322.2$, $r = 0.9997$ 。结果表明连翘苷在 0.042 ~ 0.42 μ g 与峰面积的线性关系良好。

5.6 精密度试验: 精密吸取 21 μ g/mL 连翘苷对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,连续进样测定,记录峰面积,其结果 RSD 为 0.53 % ($n=6$)。

5.7 重现性试验: 精密称取同一批五福化毒丸碎块 6 g,精密称定 6 份,制备供试品溶液,进样测定,记录连翘苷峰面积,计算其 RSD 为 1.14 %。

5.8 稳定性试验: 取同一供试品溶液,分别在 0.0、2.0、4.0、6.0、8.0、12 h 进样,测定连翘苷峰面积,计算得其 RSD 为 1.11 %,说明供试品溶液在 12 h 内稳定。

5.9 回收率试验: 称取样品 6 份,每份 3 g,精密称

定,每份按连翘苷质量 1:1 的比例加入连翘苷对照品,制备供试品溶液,进样测定。计算得连翘苷平均回收率为 98.49%,RSD 为 1.12%。

5.10 样品测定:取不同批号的五福化毒丸,剪碎,

每批称定 2 份,每份 6 g,制备供试品溶液,微量注射器准确吸取样品液 10 μ L 注入高效液相色谱仪,进样测定,以外标法计算连翘苷的质量分数。结果见表 1,色谱图见图 5。

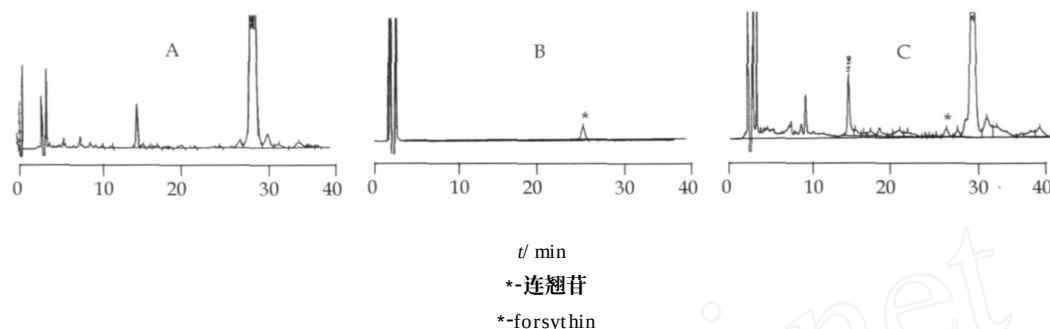


图 5 阴性对照(A)、连翘苷对照品(B)和五福化毒丸(C)的 HPLC 色谱图

Fig 5 HPLC Chromatograms of negative sample (A), forsythine reference substance (B), and Wufu Huadu Pill (C)

6 讨论

本实验采用显微鉴别的方法对五福化毒丸进行显微鉴别,鉴别出全方 11 味中药,排除了干扰,结果较令人满意。明确了对黄连、赤芍确实可行的薄层

色谱鉴别方法。对方中的甘草酸和连翘苷进行了高效液相色谱法的测定,本实验的方法简便可行,结果稳定,重复性好,可以用于五福化毒丸的质量标准的研究。

辛夷鼻炎丸的质量标准研究

黄杰芳,李惠霞,邓慧敏*

(广州中一药业有限公司,广东 广州 510530)

摘要:目的 提高完善辛夷鼻炎丸的质量标准。方法 采用 TLC 法对方中的鹅不食草、苍耳子、防风进行了定性鉴别;采用 HPLC 法测定防风中的升麻素苷进行了测定。结果 在 TLC 图谱中可检出鹅不食草、苍耳子、防风的特征斑点;升麻素苷在 50.02 ~ 1 004.0 μ g 线性良好,精密度试验 RSD 为 1.17% ($n=6$),加样回收率为 101.4%,RSD 为 1.03% ($n=9$)。结论 定性、定量方法简便、准确,能有效控制辛夷鼻炎丸的质量。

关键词:辛夷鼻炎丸;鹅不食草;苍耳子;防风;升麻素苷;薄层色谱;高效液相色谱

中图分类号:R286.02 **文献标识码:**B **文章编号:**0253-2670(2009)08-1245-03

辛夷鼻炎丸为国家中药保护品种,由辛夷、苍耳子、鹅不食草、防风、甘草等 13 味中药组成,具有祛风清热,消炎解毒之功效。其中苍耳子、鹅不食草、防风为方中主药,用量较大。本实验对鹅不食草、苍耳子、防风进行薄层色谱鉴别,并以高效液相色谱法测定防风中的升麻素苷。方法可靠,重复性好,可为辛夷鼻炎丸的研究提供了定性、定量的检测方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪(自动进样器,二元泵,DAD 检测器);Reprostar 3 薄层色谱摄影仪。

D-101 大孔树脂柱;硅胶 G(青岛海洋化工厂);

鹅不食草(批号 1053-0301)、苍耳子(批号 121168-200503)、防风对照药材(批号 120947-200405)、升麻素苷对照品(批号 111522-200404)均由中国药品生物制品检定所提供;甲醇为色谱纯;水为蒸馏水;其余试剂均为分析纯;辛夷鼻炎丸由广州中一药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 鹅不食草的薄层色谱鉴别:取本品 2 g,研细,加醋酸乙酯 20 mL,超声 30 min,滤过,滤液蒸干,残渣加醋酸乙酯 2 mL 使溶解,作为供试品溶液。取鹅不食草对照药材和缺鹅不食草的阴性样品各 2 g,

* 收稿日期:2008-11-27

作者简介:黄杰芳(1982—),女,广东省四会市人,制药助理工程师,广州中一药业有限公司产品开发部工作,研究方向:药品质量标准。
Tel:13570990594 E-mail:zoedeed@hotmail.com